

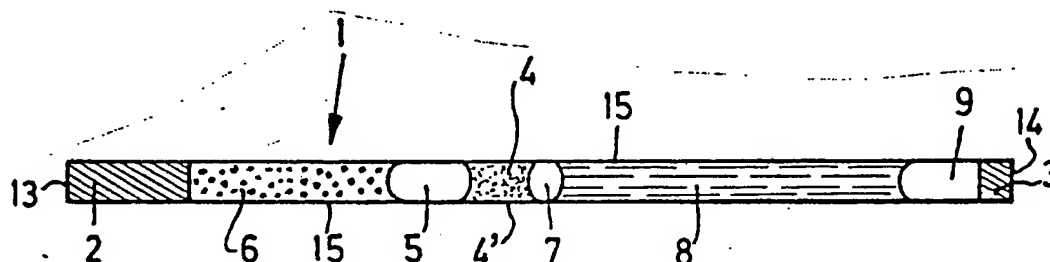


## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>3</sup> : <b>A01N 1/02; A61D 7/02</b>		A1	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 83/ 02386</b> (43) Date de publication internationale: 21 juillet 1983 (21.07.83)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR83/00010 (22) Date de dépôt international: 14 janvier 1983 (14.01.83) (31) Numéros des demandes prioritaires: 82/00645 82/11603 (32) Dates de priorité: 15 janvier 1982 (15.01.82) 1er juillet 1982 (01.07.82) (33) Pays de priorité: FR		(74) Mandataire: PHELIP, Bruno; Cabinet Harle & Phelip, 21, rue de la Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR).  (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), GB (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.  Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRO-NOMIQUE [FR/FR]; 149, rue de la Grenelle, F-75341 Paris Cedex 07 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): RENARD, Jean-Paul [FR/FR]; 72, rue Jullien, F-92170 Vanves (FR). OZIL, Jean-Pierre [FR/FR]; 4, rue des Fontaines du Temple, F-75003 Paris (FR). HEYMAN, Yvan [FR/FR]; 14 Clos de Verrières, F-91370 Verrières Le Buisson (FR).			

(54) Title: SPANGLE FOR PRESERVING MAMMAL EMBRYOS BY FREEZING AND APPLICATION THEREOF IN EMBRYONIC TRANSPLANTATION

(54) Titre: PAILLETTE POUR LA CONSERVATION PAR CONGELATION D'EMBRYONS DE MAMIFERES ET SON APPLICATION EN TRANSPLANTATION EMBRYONNAIRE



## (57) Abstract

The spangle (1) which is filled at both its ends (13, 14) until it is used in the animal contains an embryo (4') in a cryoprotector (4) which is surrounded respectively (A) on one hand, successively in the direction of one end (13) (a) with a gas mixture (5) (b) with a growth medium (6) and (c) with a first filling and plug (2) and (B) on the other hand, successively in the direction of the other end (14) (d) with a gas bubble (7), (e) with a sucrose solution, (f) with another gas bubble (9) and (g) with a second plug (3): Application to embryonic transplantation.

## (57) Abrégé

La paillette (1) qui est scellée à ses deux extrémités (13, 14) jusqu'au moment de l'utilisation dans l'animal renferme un embryon (4') dans un cryoprotecteur (4) qui est entouré respectivement (A) d'une part successivement en direction d'une extrémité (13) (a) d'un mélange gazeux (5) (b) d'un milieu de culture (6) et (c) d'un premier bouchon extrême de scellement (2) et (B) d'autre part, successivement en direction de l'autre extrémité (14) (d) d'une bulle de gaz (7), (e) d'une solution de sucrose, (f) d'une autre bulle de gaz (9) et (g) d'un deuxième bouchon (3): Application en transplantation embryonnaire.

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	LI	Liechtenstein
AU	Australie	LK	Sri Lanka
BE	Belgique	LU	Luxembourg
BR	Brésil	MC	Monaco
CF	République Centrafricaine	MG	Madagascar
CG	Congo	MR	Mauritanie
CH	Suisse	MW	Malawi
CM	Cameroun	NL	Pays-Bas
DE	Allemagne, République fédérale d'	NO	Norvège
DK	Danemark	RO	Roumanie
FI	Finlande	SE	Suède
FR	France	SN	Sénégal
GA	Gabon	SU	Union soviétique
GB	Royaume-Uni	TD	Tchad
HU	Hongrie	TG	Togo
JP	Japon	US	Etats-Unis d'Amérique
KP	République populaire démocratique de Corée		

1.

" Paillette pour la conservation par congélation  
d'embryons de mammifères et son application  
en transplantation embryonnaire "

La présente invention concerne la conservation  
5 par congélation d'embryons de mammifères. De tels em-  
bryons trouvent application dans la transplantation em-  
bryonnaire.

On connaît dans l'art antérieur des petits tu-  
bes en matière plastique, dénommés paillettes, contenant  
10 des spermatozoïdes dans un liquide approprié.

Par ailleurs, on sait que, pour congeler un em-  
bryon, il faut utiliser un cryoprotecteur. Cependant le  
retrait de ce cryoprotecteur après décongélation est né-  
cessaire pour assurer une viabilité ultérieure de l'em-  
15 bryon. On a proposé la congélation d'un embryon bovin  
dans une paillette d'une structure différente de celle  
de la présente invention, dans laquelle il n'est pas  
prévu la dilution du cryoprotecteur après décongélation.

La présente invention fournit une paillette d'-  
20 une structure nouvelle, qui permet de retirer le cryo-  
protecteur sans manipuler l'embryon.

Dans la paillette selon la présente invention,  
l'embryon est conditionné avant la congélation et ladite  
paillette est utilisée en l'état au moment de la trans-  
25 plantation.

La présente invention propose une paillette  
scellée avec laquelle il n'est plus nécessaire d'effec-  
tuer de nombreuses manipulations de l'embryon, comme ce-  
la était le cas avec la technique antérieure. Ainsi,  
30 plus précisément, un seul conditionnement est maintenant  
nécessaire, savoir celui utilisé pour la mise en place  
dans l'utérus de la femelle réceptrice.

Grâce à la paillette selon l'invention, on peut  
utiliser l'embryon congelé, à la ferme, sans aucune mani-



## 2.

pulation à l'échelle microscopique. On peut stocker dans un récipient cryogénique transportable les embryons immédiatement disponibles. Toutes les techniques selon l'art antérieur nécessitaient auparavant l'intervention obligatoire d'un biologiste pour, après décongélation, manipuler l'embryon sous loupe binoculaire.

La présente invention a pour objet une paillette pour la conservation par congélation d'embryons de mammifères dans un milieu de conservation capable d'être  
10 congelé et décongelé et comprenant une substance cryoprotectrice (ou cryoprotecteur) qui pénètre à l'intérieur des cellules de l'embryon, ladite paillette étant caractérisée en ce qu'elle est scellée à ses extrémités jusqu'au moment de l'utilisation dans le mammifère et en  
15 ce que l'embryon dans le milieu de conservation par congélation est entouré respectivement :

- (A) d'une part, successivement en direction d'une extrémité, (a) d'un mélange gazeux, (b) d'un milieu de culture, et (c) d'un premier bouchon extrême de  
20 scellement,

- (B) et d'autre part, successivement en direction de l'autre extrémité, (d) d'une bulle de gaz, (e) d'une solution d'au moins une substance miscible à l'eau, peu ou pas toxique à la température ambiante vis-à-vis  
25 de l'embryon, qui ne pénètre pas à l'intérieur des cellules de l'embryon mais qui assure à l'extérieur de celui-ci une pression osmotique suffisante pour permettre une diffusion progressive du cryoprotecteur à l'extérieur des cellules, la disposition étant telle que, à la dé-  
30 congélation, l'embryon dans son milieu de conservation est mis directement en contact avec ladite solution, (f) d'une autre bulle de gaz et (g) d'un deuxième bouchon extrême de scellement.

La présente invention concerne aussi une pail-



## 3.

lette munie d'un jonc d'identification pour la conservation par congélation d'embryons de mammifères.

Il existe à l'heure actuelle un besoin d'identification d'un embryon congelé dans une paillette telle que celle décrite dans la présente invention.

Les paillettes de l'invention avant utilisation sont conservées dans de l'azote liquide. Elles portent généralement sur leur corps diverses informations nécessaires à l'identification comme les références de l'organisme ayant congelé les embryons, la date de congélation, la race et les références de la donneuse.

Etant donné que ces indications sont portées directement sur le corps de la paillette, un opérateur doit pour l'identification sortir pendant quelques instants la paillette de l'azote liquide afin de lire lesdites indications.

L'embryon qui est généralement congelé dans un volume de 10 à 40  $\mu$ l se réchauffe très rapidement dès qu'on le sort de l'azote liquide. Il est bien connu que la vitesse de réchauffement entre  $-196^{\circ}\text{C}$  et  $-60^{\circ}\text{C}$  est sensiblement de l'ordre de  $360^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

La lecture effectuée directement sur la paillette est donc une source de réchauffement non contrôlée qui favorise la recristallisation du milieu congelé.

Une telle recristallisation est d'autant plus marquée quand les cellules contiennent une certaine quantité de glace intracellulaire (FARRANT, HEATHER and WALTER, 1977 - Effects of interactions between cooling and rewarming conditions on survival of cells. In : "The freezing of Mammalian embryos, Ciba Foundation Symposium, 52, Elsevier, Excerpta Medica, North Holland). Or, c'est précisément le cas avec le type de congélation actuellement utilisé pour les embryons.

Il existe donc un problème concernant l'identi-



4.

fication.

Il existe en outre un problème concernant le calibrage de la bulle de gaz qui est située entre la fraction contenant le cryoprotecteur et par conséquent l'embryon et la fraction qui, après décongélation, assure la dilution du cryoprotecteur.

La présente invention apporte une solution à ces problèmes en proposant une paillette pourvue d'un bouchon assurant tant une identification précise de l'embryon placé dans ladite paillette qu'une possibilité de calibrage de la bulle de gaz sus-mentionnée, tout en permettant un montage plus aisé de la paillette.

Selon la présente invention, il est prévu une paillette pour la conservation par congélation d'embryons de mammifères dans un milieu de conservation capable d'être congelé et décongelé et comprenant une substance cryoprotectrice (ou cryoprotecteur) qui pénètre à l'intérieur des cellules de l'embryon, ladite paillette étant scellée à ses deux extrémités jusqu'au moment de l'utilisation dans le mammifère, l'embryon dans le milieu de conservation par congélation étant entouré respectivement : (A) d'une part successivement en direction d'une extrémité (a) d'un mélange gazeux, (b) d'un milieu de culture et (c) d'un premier bouchon extrême de scellement, et

(B) d'autre part successivement en direction de l'autre extrémité, (d) d'une bulle de gaz, (e) d'une solution d'au moins une substance miscible à l'eau, peu ou pas toxique à la température ambiante vis-à-vis de l'embryon qui ne pénètre pas à l'intérieur des cellules de l'embryon et qui assure à l'extérieur de celui-ci une pression osmotique suffisante pour permettre une diffusion progressive du cryoprotecteur à l'extérieur des cellules, la disposition étant telle que, à la décongé-



5.

lation, l'embryon dans son milieu de conservation est mis directement en contact avec la solution, (f) d'une autre bulle de gaz et (g) d'un deuxième bouchon extrême de scellement, paillette dans laquelle le deuxième bouchon extrême de scellement est un jonc en matière synthétique dont le corps est plus large que celui de ladite paillette et dont l'extrémité dudit jonc, provoquant l'éclatement de la bulle qui, lors de la décongélation, s'élève le long de la fraction du milieu assurant la dilution du cryoprotecteur, est emmanchée à force par au moins un méplat dans l'une des extrémités de la paillette après son remplissage à raison d'une longueur qui est choisie à volonté pour calibrer avec précision ladite bulle.

15 La présente invention concerne également les caractéristiques ci-après, considérées isolément ou selon toutes leurs combinaisons techniquement possibles :

- le mélange gazeux (a) est choisi parmi l'air, l'azote, des mélanges gazeux binaires ou ternaires;

20 - le mélange gazeux (a) est constitué d'azote, d'oxygène et de gaz carbonique, notamment à raison de 90 % d'azote, de 5 % d'oxygène et de 5 % de gaz carbonique;

- le milieu de culture (b) est un milieu de culture in vitro à tampon carbonate ou phosphate, par exemple un tampon carbonate comprenant essentiellement du glucose, des sels minéraux et des acides aminés, ou un milieu à tampon phosphate de type PBS;

- le cryoprotecteur est le glycérol, le diméthylsulfoxyde ou le propanediol;

- la bulle de gaz (d) placée entre l'embryon et la solution (e) est formée par l'air, l'azote ou des mélanges de gaz binaires ou ternaires;

- la solution (e) contient du sucre et un



## 6.

- tampon salin (phosphate ou carbonate);
- la solution (e) contient de la polyvinylpyrrolidone et un tampon salin (phosphate ou carbonate);
  - la normalité du tampon salin de la solution
- 5 (e) est fonction de la molarité de la substance qu'elle contient, la règle étant que plus la molarité de la substance augmente, plus la normalité du tampon diminue;
- la bulle de gaz (f) placée entre la solution (e) et le deuxième bouchon (g) est formée par l'air,
- 10 l'azote ou des mélanges de gaz binaires ou ternaires;
- la paillette est congelée horizontalement;
  - le rapport en volume des éléments constitutifs pour un volume global d'une paillette de 500 microlitres se situe dans la gamme suivante :
- |    |  |                 |
|----|--|-----------------|
| 15 | embryon  | 40 microlitres  |
|    | mélange gazeux (a)   | 50 microlitres  |
|    | milieu de culture (b)  | 150 microlitres |
|    | bulle de gaz (d) placée entre l'embryon et la solution (e)           | 20 microlitres  |
| 20 | solution (e)   | 200 microlitres |
|    | bulle de gaz (f) placée entre la solution et le deuxième bouchon (g) | 40 microlitres. |
- l'extrémité du jonc assurant l'éclatement de la bulle présente une forme de calotte sphérique,
- 25 - l'extrémité du jonc assurant l'éclatement de la bulle présente une forme de tronc de cône;
- l'extrémité du jonc assurant l'éclatement de la bulle présente une forme de cône;
  - la forme en tronc de cône ou de calotte sphérique de l'extrémité du jonc est surmontée d'une courte
- 30 pointe;
- le corps du jonc comporte des symboles nécessaires à l'identification de la paillette;
  - le jonc est en matière plastique injectée;





- le jonc est en polychlorure de vinyle;
- l'emmanchement à force du jonc est renforcé en soumettant la zone de jonction à une opération de soudage.

5 L'invention sera encore illustrée sans être aucunement limitée en référence aux dessins annexés sur lesquels :

Fig. 1 représente la structure d'une paillette selon la présente invention avant la congélation,

10 Fig. 2 illustre la même paillette que celle de la figure 1 lors de la décongélation et de la dilution du cryoprotecteur avant l'application de la paillette en transplantation embryonnaire,

Fig. 3 illustre la structure d'une paillette 15 munie d'un jonc d'identification selon la présente invention avant la congélation,

Fig. 4 est un détail de l'extrémité d'un jonc en forme de calotte sphérique,

Fig. 5 est un détail de l'extrémité d'un jonc 20 en forme de tronc de cône,

Fig. 6 est un détail de l'extrémité d'un jonc en forme de cône.

Sur la figure 1, la paillette selon la présente invention est désignée dans son ensemble par 1. Elle est 25 obturée à ses deux extrémités 13, 14 par un bouchon, les deux bouchons étant symbolisés respectivement par 2 et 3. Le premier bouchon 2 est un bouchon classique constitué de coton imbibé d'alcool polyvinylique. Un tel bouchon a été décrit dans le brevet FR 1.472.139. Le deu- 30 xième bouchon 3 peut être un bouchon identique à celui du bouchon 2, toutefois cela n'est pas nécessaire et il peut s'agir d'un simple bouchon d'alcool polyvinylique. Une paillette 1 d'une contenance de 500 microlitres présente une dimension de 13 cm pour un diamètre de 2,7



8.

centimètres. L'embryon 4' se trouve dans le milieu de conservation par congélation. Celui-ci peut être tout milieu connu à cet effet. Il s'agit d'un milieu tamponné et additionné d'un cryoprotecteur 4 constitué, par exemple, de glycérol, de diméthylsulfoxyde ou de propenediol. Pour avoir plus de renseignements au sujet d'un tel milieu de conservation par congélation, l'homme de l'art pourra se référer à l'ouvrage : The Freezing of Mammalian Embryos Ciba Foundation Symposium 52 Elsevier North Holland, 1977 et à la publication Renaud et al. 1981 : Teriogenology, 15,113. A titre d'exemple, la concentration du cryoprotecteur (glycérol) 4 est d'environ 1 à 1,5 M. Pour une paillette 1 de 500 microlitres, le volume de l'embryon 4' dans le milieu de conservation par congélation représente 40 microlitres, celui-ci est entouré respectivement du côté tourné vers le bouchon 2 par 50 microlitres d'un mélange gazeux 5. Le mélange gazeux 5 peut être de l'air, de l'azote ou il peut comprendre des mélanges binaires ou ternaires. A titre d'exemple, le mélange gazeux 5 peut être constitué d'azote, d'oxygène et de gaz carbonique notamment à raison de 90 % d'azote, de 5 % d'oxygène et de 5 % de gaz carbonique. Entre le mélange gazeux 5 dont le volume représente, comme indiqué ci-dessus, sensiblement 50 microlitres et le bouchon 2 se trouve le milieu de culture 6. Le milieu de culture 6 est tout milieu approprié à la culture in vitro. Un exemple spécifique d'un tel milieu est un milieu tampon carbonate mis sur le marché par la société API FRANCE sous la dénomination "Milieu B<sub>2</sub> INRA MENEZO" et qui comprend essentiellement du glucose, des sels minéraux, des acides aminés. Un autre milieu 6 utilisable est celui disponible sous la dénomination générique PBS qui est un milieu tampon-phosphate; un milieu PBS est notamment décrit par Whittingham dans "Journal of Repro-



duction and Fertility Supplement 14:7-21 - 1971. Le milieu de culture in vitro 6 permet à la fois la viabilité de l'embryon 4' et la reprise normale de l'activité métabolique de celui-ci après décongélation. Sur le côté 5 tourné vers le bouchon 3, l'embryon 4' dans le milieu de conservation par congélation renfermant le cryoprotecteur 4, est entouré par une bulle de gaz 7 d'un volume de 20 microlitres puis d'une solution 8 d'au moins une substance miscible à l'eau, peu ou pas toxique à la température ambiante vis-à-vis de l'embryon, qui ne pénètre pas à l'intérieur des cellules de l'embryon 4' mais qui assure à l'extérieur de l'embryon une pression osmotique suffisante pour permettre une diffusion progressive du cryoprotecteur 4 à l'extérieur des cellules; cette solution 8 étant désignée par 8 et, dans l'exemple choisi, occupe un volume de 200 microlitres. Enfin, une autre bulle de gaz 9, de volume de 40 microlitres, sépare la solution 8 du bouchon 3.

Les deux bulles de gaz 7 et 9 peuvent être constituées d'air, d'azote ou comprendre des mélanges de gaz binaires ou ternaires. La substance préférée pour la solution 8 est le sucre. La solution 8 contient par exemple du sucre et un tampon (phosphate ou carbonate) dont la normalité est choisie en fonction de la molarité du sucre. Plus la molarité du sucre augmente, plus la normalité du tampon diminue. Une combinaison qui a donné de bons résultats est constituée de sucre 0,25M pour un tampon de 1 N. On peut remplacer le sucre par de la polyvinylpyrrolidone, les conditions ci-dessus indiquées étant les mêmes.

La solution 8 est une fraction permettant le retrait partiel du cryoprotecteur 4 à l'extérieur des cellules de l'embryon 4'. Il est bien certain qu'une fraction minime de cryoprotecteur 4 restera de toute fa-



10.

çon. La disposition dans la paillette 1 selon la présente invention est telle que, à la décongélation, l'embryon 4' dans son milieu de conservation est mis directement en contact avec la solution 8.

5 La bulle de gaz 7 est une fraction qui disparaît au cours du réchauffement et qui permet la jonction de la solution 8 et du cryoprotecteur 4, tandis que le mélange gazeux 5 a pour effet de maintenir séparé jusqu'au transfert in utero le mélange de cryoprotecteur et  
10 de solution désigné par 11 et le milieu de culture 6.

La solution 8 ne pénètre pas dans les cellules embryonnaires mais permet en élevant la pression osmotique du milieu, de limiter notamment les chocs osmotiques sur les membranes cellulaires lors de la diffusion passive du cryoprotecteur 4 à l'extérieur des cellules de  
15 l'embryon 4'.

Les différentes fractions selon la structure ci-dessus sont placées par simple aspiration à l'aide d'une seringue de 1 ml dans la paillette 1 selon la présente invention. La paillette 1 est scellée à ses deux  
20 extrémités 13, 14 à l'aide des deux bouchons 2 et 3 et l'ensemble tel qu'illustré sur la figure 1 est ensuite congelé horizontalement.

La figure 2 illustre la décongélation et la dilution du cryoprotecteur 4 qui dans l'exemple choisi est du glycérol 1,5 M. Lors de la décongélation, la paillette 1 est disposée verticalement dans un bain-marie à une température sensiblement de 37°C désigné sur la figure 2  
25 par 10.

30 La solution 8, moins concentrée que la solution de cryoprotecteur 4, commence à fondre la première à partir des parois 15 de la paillette 1; ainsi, à la température de décongélation, la solution 8 dont la concentration est inférieure à celle du milieu de conservation



par congélation, commence à fondre la première, ce qui permet à la bulle de gaz 7, dès le début du changement de température accompagnant la décongélation, de s'élever à l'intérieur de la paillette 1; les dimensions de ladite bulle de gaz 7 sont définies de sorte que cette ascension se fasse progressivement. Le volume du mélange gazeux 5 qui est de plus grosse dimension que la bulle de gaz 7, reste pratiquement inchangé et maintient la séparation entre le milieu de conservation et le milieu de culture 6. On obtient ainsi dès la décongélation un mélange sucrose-glycérol 11. Le rapport des volumes de 1 à 5 glycérol : sucrose permet la diffusion progressive du glycérol. En retournant la paillette 1, une fois dans chaque sens pendant 5 à 7 minutes, on permet à l'embryon 4' de circuler tout le long de la colonne de liquide ce qui contribue à une diffusion homogène du cryoprotecteur 4.

La paillette 1 tenue verticalement, est coupée à son extrémité supérieure, puis montée dans un pistolet de transplantation 12. Une partie du milieu de dilution 11, constitué de glycérol et de sucrose dans le présent exemple, est expulsée avant mise en place de l'embryon 4'. Le mélange avec le milieu de culture 6 est ainsi assuré au cours du dépôt de l'embryon 4' dans l'utérus de la receveuse. Sur la figure 2 les mêmes symboles de référence désignent des parties identiques à celles de la figure 1.

Sur les figures 3 à 6, la paillette est désignée dans son ensemble par 1 et ses parois par 15. Elle est obturée à une de ses extrémités 13 par un bouchon 2, qui est par exemple un bouchon d'alcool polyvinylique. L'embryon 4' se trouve dans un cryoprotecteur 4 et est entouré respectivement par un mélange gazeux 5 et une bulle de gaz 7. Entre le mélange gazeux 5 et le bouchon



12.

2 se trouve le milieu de culture 6. Une solution 8 d'au moins une substance miscible à l'eau, peu ou pas toxique à la température ambiante, vis-à-vis de l'embryon, qui ne pénètre pas à l'intérieur des cellules de l'embryon 5 4' mais qui assure à l'extérieur de l'embryon une pression osmotique suffisante pour permettre une diffusion progressive du cryoprotecteur 4 à l'extérieur des cellules, est prévue entre la bulle de gaz 7 et une autre bulle de gaz 9 qui sépare ladite solution 8 du bouchon 10 3.

Le bouchon 3 qui est prévu à l'extrémité 14 de la paillette 1 est un jonc 31, en matière plastique dont le corps 32 est plus large que celui de la paillette 1. Ce jonc 31 est serti ou emmanché à force à une de ses 15 extrémités 34 pourvue au moins d'un méplat dans l'extrémité 14 de la paillette 1. L'extrémité 34 du jonc 31 en forme de calotte sphérique 34a, de tronc de cône 34b ou de cône 34c muni ou non d'une fine pointe 34d facilite après la décongélation l'éclatement de la bulle 7 lors- 20 qu'elle arrive au contact du jonc 31, ce qui évite lors du retournement de la paillette 1 un mouvement de retour de la bulle 7 à l'intérieur de la paillette 1. Un tel mouvement peut perturber le déplacement de l'embryon 4' le long de la colonne constituée par le mélange des 25 fractions 4 et 8. Le jonc 31 est emmanché après le remplissage de la paillette 1 à raison d'une longueur qui est choisie à volonté pour calibrer avec précision la bulle 7. Grâce à un effet de piston dû à l'emmanchement réglable du jonc 31, la bulle 7 peut être calibrée avec 30 une très grande précision. Le jonc 31 comporte des symboles nécessaires à l'identification de la paillette 1; il est donc possible, selon la présente invention, tout en maintenant la possibilité de porter une identification directement sur la paillette 1, d'inscrire les sym-



boles sur le jonc de matière plastique 31 qui possède une certaine inertie thermique et qui est serti dans l'extrémité 14 de la paillette 1. Pour la lecture, seule la sortie du jonc de matière plastique 31 hors de l'azote liquide est nécessaire, la paillette proprement dite 1 étant laissée dans l'azote liquide. Le recours à un code de couleurs corps 32 du jonc 31 - extrémité 14 permet une première identification pour des lots de paillettes stockées dans le récipient d'azote liquide. Pour que la longueur paillette 1 - jonc 31 reste compatible avec les possibilités de stockage dans les différents récipients disponibles actuellement sur le marché, la longueur totale de la paillette 1 est réduite comme indiqué ci-après.

15 Comme on l'a mentionné ci-dessus, le jonc-bouchon 3, 31 permet également un montage plus aisé de la paillette. En effet pour pouvoir monter dans la paillette 1 à la décongélation, la bulle 7 doit être de volume réduit : 20  $\mu$ l pour les paillettes de 500  $\mu$ l, 6-8  $\mu$ l pour les paillettes de 250  $\mu$ l. Le calibrage de la bulle 7 doit être effectué avec précision lors du montage de la paillette 1. Si l'on prélève un volume d'air légèrement inférieur, le risque de mélange des deux fractions existe et il faut recommencer l'opération. Le jonc de matière plastique 31 au cours de l'emboîtement à l'extrémité 14 de la paillette 1 comprime les fractions gazeuses au montage et leur volume diminue. Cette diminution de volume liée à la longueur du jonc 31 inséré dans la paillette 1 rend plus aisé le montage : l'opérateur peut prélever un volume plus important et contrôler à la fin des opérations le volume des fractions d'air ou mélange gazeux, en jouant sur la longueur du jonc 31 inséré dans la paillette 1.

L'emmanchement à force ou sertissage du jonc en



matière plastique 31 dans la paillette 1 peut être éventuellement renforcé en soumettant la zone de jonction aux effets d'un soudage. Un tel procédé, par exemple, à l'aide d'une courte impulsion de soudage permet de par-

5 faire la soudure des deux éléments en matière plastique afin de garantir l'inviolabilité de la paillette 1.

Selon la présente invention, on a réalisé des paillettes de diamètre interne de 2,8 mm (correspondant à celui des paillettes de 500,ul ) et des paillettes de

10 diamètre interne de 1,7 mm (correspondant à celui de paillettes de 250,ul ).

On indique ci-après le rapport en volume et en longueur des éléments constitutifs pour une paillette de petit diamètre, savoir 250,ul.

15 Fraction	Longueur en mm	Volume Approximatif en ,ul
Embryon (4-4')	5	12
Mélange gazeux (5)	10	24
Bulle de gaz (7) entre l'em-		
20 bryon (4-4') et la solution (8)	2,5	6
Solution sucrose (8)	25	55
Milieu de culture (6)	25	55
Bulle d'air terminale (9)	2,5	6
Total paillette (1)		
25 sans bouchon (2)	70	<u>~</u> 160
Longueur totale paillette		
(1) sans jonc (31)	87	-
Longueur jonc (31)	55	-
Longueur totale	142	-

30 La présente invention est applicable aux mammifères. Les meilleurs résultats ont été obtenus sur les embryons de bovins, d'ovins et de caprins. Toutefois, il importe de remarquer que la présente invention n'est pas limitée à l'application aux ovins, bovins et caprins.





La paillette 1 de la présente invention a été utilisée en transplantation embryonnaire. Les résultats obtenus sont les suivants :

Sur 30 embryons congelés, puis cultivés in vitro, 24 heures ou 48 heures après décongélation, 25 se sont normalement développés. Ce nombre représente un rendement de 83,3 %.

Sur 14 embryons congelés, puis transplantés directement après congélation, 7 gestations à 55 jours ont été obtenues avec des taux de survie de 50 %. Les techniques utilisées selon l'art antérieur ne permettaient qu'un taux de survie de 35 %.

La présente invention réside dans la structure particulière ci-dessus décrite de la paillette 1. Il est clair que la matière plastique constituant les parois 15 est une matière plastique habituellement utilisée dans les paillettes, selon la technique antérieure et ne rentre pas dans le cadre de la présente invention.

Enfin, il importe d'observer que la capacité de la paillette 1 de 500 microlitres peut varier et il est possible de réaliser des paillettes dont le volume peut être différent comme par exemple des paillettes de 250 microlitres.

La présente invention propose donc également une paillette munie d'un jonc d'identification pour la conservation par congélation d'embryons de mammifères, ledit jonc en matière plastique 31 permettant de réaliser une identification précise de l'embryon placé dans la paillette 1 et de calibrer à volonté la bulle de gaz tout en rendant le montage de ladite paillette 1 plus aisé. Il convient de remarquer que le jonc 31 peut être réalisé en toute matière plastique compatible avec les fractions de la paillette 1. A titre d'exemple, ce jonc 31 est réalisé en polychlorure de vinyle, toutefois, il



est bien entendu que toutes les matières similaires conviennent aussi. Les symboles d'identification sur le jonc 31 peuvent être réalisées selon toutes manières convenables, par exemple ces identifications peuvent être imprimées en utilisant une matrice en caoutchouc.

La différence de largeur entre le corps 32 du jonc 31 et le corps de la paillette 1 peut varier à volonté, cependant on préfère que le corps 32 du jonc 31 soit seulement légèrement supérieur au corps de la paillette 1.

L'invention n'est pas limitée aux modes de réalisation représentés et décrits et elle englobe les différents équivalents techniques et modifications à la portée de l'homme du métier.



## REVENDICATIONS.

1. Paillette pour la conservation par congélation d'embryons de mammifères dans un milieu de conservation capable d'être congelé et décongelé et comprenant 5 une substance cryoprotectrice (ou cryoprotecteur) (4) qui pénètre à l'intérieur des cellules de l'embryon (4'), ladite paillette (1) étant caractérisée en ce qu'elle est scellée à ses deux extrémités (13, 14) jusqu'au moment de l'utilisation dans le mammifère et en ce que 10 l'embryon (4') dans le milieu de conservation par congélation, est entouré respectivement :

- (A) d'une part, successivement en direction d'une extrémité (13), (a) d'un mélange gazeux (5), (b) d'un milieu de culture (6) et (c) d'un premier bouchon 15 extrême de scellement (2),

- (B) et d'autre part, successivement en direction de l'autre extrémité (14) (d) d'une bulle de gaz (7), (e) d'une solution (8) d'au moins une substance miscible à l'eau, peu ou pas toxique à la température 20 ambiante vis-à-vis de l'embryon (4') qui ne pénètre pas à l'intérieur des cellules de l'embryon (4') mais qui assure à l'extérieur de celui-ci une pression osmotique suffisante pour permettre une diffusion progressive du cryoprotecteur (4) à l'extérieur des cellules, la disposition 25 étant telle que, à la décongélation, l'embryon (4') dans son milieu de conservation est mis directement en contact avec ladite solution (8), (f) d'une autre bulle de gaz (9) et (g) d'un deuxième bouchon extrême de scellement (3).

30 2. Paillette selon la revendication 1, caractérisée en ce que le mélange gazeux (a) (5) est choisi parmi l'air, l'azote, des mélanges gazeux binaires ou ternaires.

3. Paillette selon l'une des revendications 1



ou 2, caractérisée en ce que le mélange gazeux (a) (5) est constitué d'azote, d'oxygène et de gaz carbonique, notamment à raison de 90 % d'azote, de 5 % d'oxygène et 5 % de gaz carbonique.

5           4. Paillette selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le milieu de culture (b) (6) est un milieu de culture in vitro à tampon carbonate ou phosphate, par exemple à tampon carbonate, comprenant essentiellement du glucose, des sels minéraux et  
10 des acides aminés ou un milieu à tampon phosphate de type PBS.

          5. Paillette selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le cryoprotecteur (4) est le glycérol, le diméthylsulfoxyde ou le  
15 propanediol.

          6. Paillette selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la bulle de gaz (d) (7) placée entre l'embryon (4') et la solution (e) (8) est formée par l'air, l'azote ou les mélanges de gaz  
20 binaires ou ternaires.

          7. Paillette selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que la solution (e) (8) contient du sucrose et un tampon salin (phosphate ou carbonate).

25           8. Paillette selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que la solution (e) (8) contient de la polyvinylpyrrolidone et un tampon salin (phosphate ou carbonate).

          9. Paillette selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la normalité du  
30 tampon salin de la solution (e) (8) est fonction de la molarité de la substance qu'elle contient.

          10. Paillette selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que la règle est que



plus la molarité de la substance augmente, plus la normalité du tampon diminue.

11. Paillette selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la bulle de gaz 5 (b) (9) placée entre la solution (e) (8) et le deuxième bouchon (g) (3) est formée par l'air, l'azote ou des mélanges de gaz binaires ou ternaires.

12. Paillette selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce qu'elle est congelée horizontalement.

13. Paillette selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que le rapport en volume des éléments constitutifs pour un volume global d'une paillette (1) de 500 microlitres se situe dans la 15 gamme suivante :

	embryon (4')	40 microlitres
	mélange gazeux (5)	50 microlitres
	milieu de culture (b) (6)	150 microlitres
20	bulle de gaz (d) (7) placée entre l'embryon (4') et la solution (e) (8)	20 microlitres
	solution (e) (8)	200 microlitres
	bulle de gaz (f) (9) placée entre la solution (e) (8) et le deuxième bouchon (g) (3)	40 microlitres

25 14. Paillette selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que le deuxième bouchon extrême de scellement (3) est un jonc (31) en matière synthétique dont le corps (32) est plus large que celui de la paillette (1) et dont l'extrémité (34) 30 dudit jonc (31) provoquant l'éclatement de la bulle (7) qui lors de la décongélation s'élève le long de la fraction du milieu assurant la dilution du cryoprotecteur, est emmanchée à force par au moins un méplat dans l'une des extrémités (14) de la paillette (1) après son rem-



plissage à raison d'une longueur qui est choisie à volonté pour calibrer avec précision ladite bulle (7).

15. Paillette selon la revendication 14, caractérisée en ce que l'extrémité (34) du jonc (31) assurant  
5 l'éclatement de la bulle (7) présente une forme de calotte sphérique (34a).

16. Paillette selon la revendication 14, caractérisée en ce que l'extrémité (34) du jonc (31) assurant  
l'éclatement de la bulle (7) présente une forme de tronc  
10 de cône (34b).

17. Paillette selon la revendication 14, caractérisée en ce que l'extrémité (34) du jonc (31) assurant  
l'éclatement de la bulle (7) présente une forme de cône  
(34c).

15 18. Paillette selon l'une des revendications  
15 ou 16, caractérisée en ce que la forme en tronc de  
cône (34b) ou de calotte sphérique (34a) de l'extrémité  
(34) du jonc (31) est surmontée d'une courte pointe  
(34d).

20 19. Paillette selon l'une quelconque des revendications 14 à 18, caractérisée en ce que le corps (32)  
du jonc (31) comporte des symboles nécessaires à l'identification de la paillette (1).

20. Paillette selon l'une quelconque des revendications 14 à 19, caractérisée en ce que le jonc (31)  
25 est en matière plastique injectée.

21. Paillette selon l'une quelconque des revendications 14 à 20, caractérisée en ce que le jonc (31)  
est en polychlorure de vinyle.

30 22. Paillette selon l'une quelconque des revendications 14 à 21, caractérisée en ce que l'emmanchement  
à force du jonc (31) est renforcé en soumettant la zone  
de jonction à une opération de soudage.

23. Paillette selon l'une quelconque des reven-



dications 14 à 22, caractérisée en ce que les rapports en volume et longueur des éléments constitutifs pour un volume global d'une paillette de 205  $\mu$ l, se situent dans la gamme suivante :

5 Fraction	Longueur en mm	Volume approximatif en $\mu$ l
Embryon (4-4')	5	12
Mélange gazeux (5)	10	24
10 Bulle de gaz (7) entre l'embryon (4-4') et la solution (8)	2,5	6
Solution sucrose (8)	25	55
Milieu de culture (6)	25	55
Bulle d'air terminale (9)	2,5	6
15 Total paillette (1) sans bou- chon (2)	70	<u>~</u> 160
Longueur totale paillette (1) sans jonc (31)	87	-
Longueur jonc (31)	55	-
Longueur totale	142	-

20 24. Application de la paillette selon l'une quelconque des revendications 1 à 23 en transplantation embryonnaire.



1/2

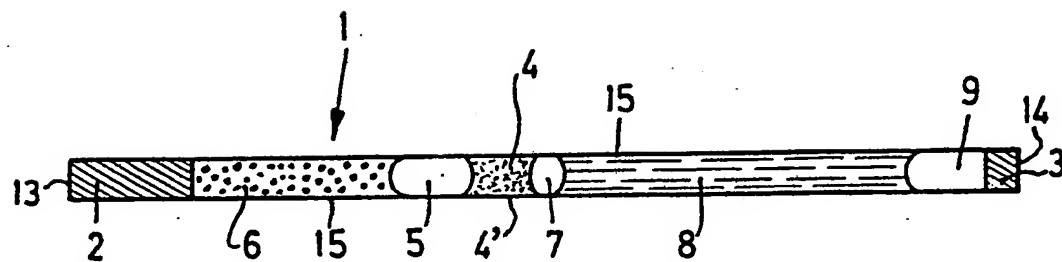


FIG. 1

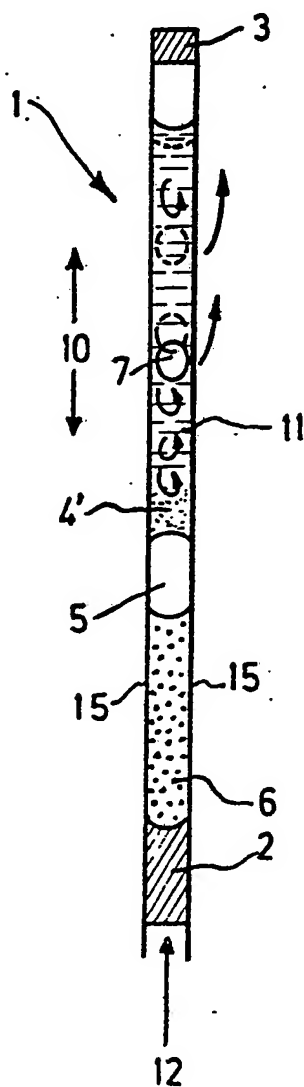


FIG. 2





2 / 2

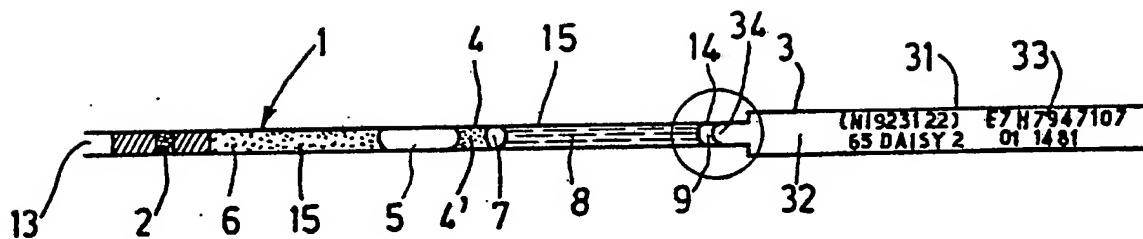


FIG. 3

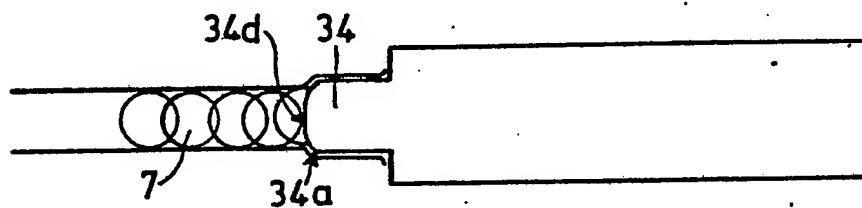


FIG. 4

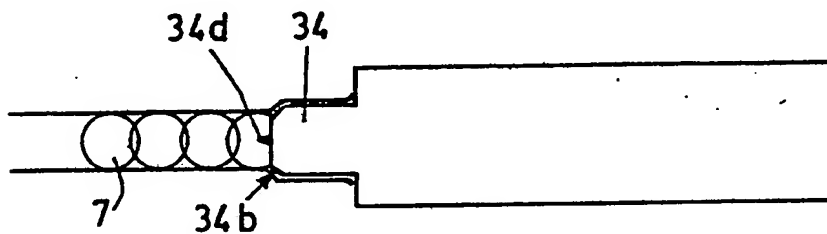


FIG. 5

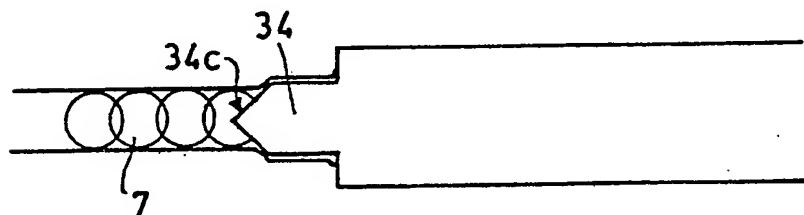


FIG. 6



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR83/000010

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>3</sup>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
IPC <sup>3</sup> : A01N 1/02; A61D 7/02		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>4</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
IPC <sup>3</sup>	A01N 1/02; A61D 7/02	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>5</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <sup>14</sup>		
Category <sup>6</sup>	Citation of Document, <sup>15</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>17</sup>	Relevant to Claim No. <sup>18</sup>
A	FR, A, 1472139 (R. CASSOU), 10 March 1967 ---	
A	DE, B, 1761571 (L. SIMMET), 09 June 1971 ---	
A	FR, A, 2254639 (I.N.R.A.), 11 July 1975 -----	
<p>* Special categories of cited documents: <sup>16</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search <sup>9</sup>	Date of Mailing of this International Search Report <sup>8</sup>	
21 March 1983 (21.03.83)	14 April 1983 (14.04.83)	
International Searching Authority <sup>1</sup>	Signature of Authorized Officer <sup>20</sup>	
European Patent Office		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (October 1981)

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 83/00010

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>3</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB. <sup>3</sup> :    A 01 N 1/02; A 61 D 7/02		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ</b>		
Documentation minimale consultée <sup>4</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB. <sup>3</sup> :	A 01 N 1/02; A 61 D 7/02	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>5</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS</b> <sup>14</sup>		
Catégorie *	Identification des documents cités, <sup>15</sup> avec indication, si nécessaire, des passages pertinents <sup>17</sup>	N° des revendications visées <sup>18</sup>
A	FR, A, 1472139 (R.CASSOU) 10 mars 1967	
A	DE, B, 1761571 (L.SIMMET) 9 juin 1971	
A	FR, A, 2254639 (I.N.R.A.) 11 juillet 1975	
-----		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités: <sup>15</sup></p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« &amp; » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <sup>1</sup>	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <sup>2</sup>	
21 mars 1983	14 AVR. 1983	
Administration chargée de la recherche internationale <sup>1</sup>	Signature du fonctionnaire autorisé <sup>10</sup>	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	 G.L.M. Kruxdenberg	

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (Octobre 1981)